蔬菜抗病篩選技術

王 添 成

亞洲蔬菜研究發展中心

台灣處於亞熱帶及熱帶，在高溫多溼的環境下栽培蔬菜，常常遭受細菌、真菌、病毒、類病毒及根瘤線蟲等的嚴重危害，因此病害的發生與危害是蔬菜生產的重要限制因子之一，所以蔬菜病害的防治已是蔬菜生產過程中不可缺少的重要工作。

一般而言，蔬菜病害防治方法可包括法規防治法、物理防治法、耕作防治法、生物防治法、化學防治法及綜合防治法等等(3,5)。到目前為止，生物防治法中應用最多的乃是選育及利用抗病品種。所謂栽培抗病品種乃是利用植物之遺傳性質降低病原的活力及致病效應，其目的在破壞病原的生活史或延遲任何接種原之產生而達到防治目的。假如有抗病品種可利用時，栽培抗病品種是一種最簡單、最便宜、最安全和最有效的病害防治方法。雖然某些蔬菜病害可以化學藥劑防治，然而在環保意識逐漸高漲的今日以及農藥殘毒威脅之陰影下，若有抗病品種可供農民利用，則必可大幅降低農藥的施用量，減低生產成本，減少不必要的環境污染而且更可讓消費者安心地食用各類蔬菜。另外，像很多引起維管束病變之病原以及病毒病等均無法有效地利用其他方法防治時，培育抗病品種即成為唯一有效之途徑。因此，近年來蔬菜作物的抗病品種之育成已較其他育種目標更受注意。美國的 85%以上蔬菜生產區域都已栽培耐病品種或抗一種或一種以上病害之抗病品種(18)。

抗病品種依其性質可分成下列兩類： 1)具專一的抗病性或垂直抗病性(specific or vertical resistance)：此類植物的抗病性是受一對基因的控制，對某些既定的病原小種或病原具有抵抗效力，抗病效力相當明顯。然而此類抗病植物也容易由於病原的變異而喪失其抗病性。環境因子如溫度等無法改變此類植物的抗病性或程度。 2)具一般的抗病性或水平抗病性(general or horizontal resistance)：此類植物的抗病性是受好幾對基因的控制，可對抗幾種不同的病原小種，所以病原不易變異產生新種摧毀寄主，因此也不容易將多量基因完全導入一新品種內。此類植物的抗病性所表現的結果並非絕對性，環境因子會影響到植物對病原的抵抗程度(3, 5, 15)。

蔬菜的抗病品種之培育已有很多顯著成功的例子，諸如抗萎凋病(Fusarium wilt)的豌豆及西瓜，抗萎凋病(Fusarium wilt, Race 1)，晚疫病(late blight)，灰斑病(gray leaf spot)，潰瘍病(bacterial canker)及 Verticillium wilt 的番茄品種，抗炭疽病(anthracnose)、瘡痂病(scab)、角斑病(angular leaf spot)及嵌紋病毒(mosaic virus)的瓜類，抗晚疫病(late blight)及瘡痂病(scab)的馬鈴薯，抗炭疽病及 halo blight 的豆類，抗疫病(Phytophthora blight)及葉斑病(Cercospora leaf spot)的番椒及抗萎凋病(Fusarium wilt)的甘藍等等，成效非凡(1,18)。

抗病育種的步驟大致上可以分為： 1)研發抗病篩選技術； 2)尋找抗病基因； 3)進行雜交及抗病基因的轉移； 4) 雜交後代的抗病篩選； 5)進行觀察、產量及區域試驗； 6)品種的命名、登記、繁殖及推廣。由此可見抗病篩選是蔬菜抗病育種的首要工作。

蔬菜病害的發生乃是由寄主、病原菌及環境等三個主要因子共同作用而產生，因此抗病篩選技術的研發需針對這三個因子詳加探討，換言之，也就是要設計一個環境讓供試植株適合發病而能檢定其抗感病反應。所以若能對下列數項工作深入研究則抗病篩選工作較容易成功而且所得結果亦較為準確。

一、寄主植物

1.寄主植物株齡大小的決定：

進行抗病篩選之前，需研究瞭解在寄主多大的株齡接種測得的抗感病反應最為穩定、正確而且經濟、有效率。近年來流行的苗期抗病性篩選是最經濟而且最有效率的檢定方法。

2.接種部位的決定：

針對病原菌侵入寄主的部位深入探討接種寄主的那個部位最容易表現病徵以及最容易鑑定其抗感性反應以作為篩選的標準。

3.抗感病對照品種的決定：

不論取自文獻或自己的測試，在正式進行抗病篩選之前，最好能對抗感病對照品種有所決定，才能使檢定結果的抗感病等級評估有所依據。

4.種子純潔度問題：

種子的純潔度常常影響篩選結果、抗感病等級的評估，需特別注意。

二、接種源

1.先瞭解病原菌的生活史，才容易訂出最適當的接種時期以及接種方法。

2.保存病原菌的最佳培養基及保存環境，以免其病原性降低或喪失。

3.病原菌有無生理小種存在及其變異問題，均需深入瞭解。

4.針對產孢的病原菌，需研發最適合其產孢之培養基及最佳的產孢環境，以便於短時間內獲得豐富的接種源。

5.探討病原菌的繁殖生長到接種所需之最適當時間，以免使用到老化的接種源而影響檢定結果。

6.探討最適當的接種濃度，才能正確地檢定抗感性反應。

三、接種方法

針對各種不同的病害，有其不同的接種方法，大致上有下列幾種：

1.菌絲塊接種(Mycelial inoculation)

2.噴霧接種(Atomized spray)：加壓與不加壓

3.注射接種(Injection)

4.針刺接種(Pin-prick)

5.磨擦接種(Leaf wounding)：人工擦拭與機械磨擦

6.土壤灌注接種(Soil-drenching)
7.切根接種(Root-wounding)
8.離葉接種(Detached-leaf culture)
9.剪葉接種(Leaf-cutting)
10.嫁接接種(Grafting)
11.種子浸漬接種(Seed soaking)
12.自然感染接種(Natural infection)
13.昆蟲媒介接種(Insect vector)
14.卵塊接種(Egg inoculation)

四、接種後環境因子的調控

寄主經人工接種病原菌後至病徵表現前的這段期間，各種環境因子諸如溫度、相對溼度、光照及葉面溼潤期間長短等等對所接種病原之侵入、感染、病斑擴展及病徵表現影響極大，因此需詳加研究這些環境因子的調控，以期能得到正確的接種結果。

五、病害嚴重度的評估及鑑定寄主抗、感病反應標準的訂定

若文獻上已有標準的病害嚴重度評估方法以及抗感病反應標準等級，則可加以利用或修正，否則就需針對已有的抗病、中等抗病、中等感病、感病等品種在多種環境下以自己收集的病原菌反覆進行檢測，以研發準確而且穩定的抗感病檢定等級。

為能讓大家對抗病篩選技術的細節更加瞭解，以下列舉亞蔬中心這些年來對於台灣的主要茄科蔬菜諸如番茄、番椒及茄子等的重要病害包括細菌、真菌、病毒、根瘤線蟲等等所研發的抗病檢定方法及進行檢定時應注意的事項供為參考(1)：

一、番茄(Tomato)

1.青枯病(Bacterial wilt) 抗病性檢定方法(9)

(1)接種植株的準備：

將供試番茄種子播種於直徑 9 公分塑膠軟盆內蒸氣消毒過的培養土(土：砂：稻殼：堆肥=3 ： 1 ： 1 ： 1 ， v/v)中，發芽後每盆疏苗成 1 株。每供試品種(系)各接種 10 株測試之。以感病品種 L 390 及抗病品種 Hawaii 7997 作為對照。當株齡 28 天時，即可進行接種。

(2)菌種保存及接種源的準備：

此病害是由 *Ralstonia solanacearum* 所引起。將 1 ml 的蒸餾水裝入 2 ml 可滅菌的塑膠保存管內，經高壓滅菌後，再移入純化的細菌，於室溫下保存。另外，也可將 1 ml 含有 30%甘油的 NB (Nutrient broth)裝於 2 ml 可滅菌的塑膠保存管內，經高壓滅菌後，再移入純化的細菌，放於-80°C 低溫保存。接種前，先將青枯病菌劃平板於 TZC 培養基(Triphenyl tetrazolium chloride medium)，放於 30°C ，經 48 小時培養，再挑取典型

的單一菌落，懸浮於無菌水中，取 0.3 ml 細菌懸浮液塗抹於 523 培養基或直接劃平板於 523 培養基增量，再放於 30°C ，經 24 小時培養作為接種源。

(3)人工接種及接種後放置的環境：

上述的每盆培養土內接種青枯病菌 Pss 4 菌株(race 1, biovar3)之懸浮液各 30 ml (A_{600}=0.3,約 10^8 cfu/ml)。接種後將植株移至溫室內，溫度需維持在 25-35°C 。

(4)病害嚴重度的調查：

接種後第 4 、 7 、 10 、 14 、 21 、 28 天調查每個供試品種(系)的萎凋百分率。最後選取存活百分率超過 30%的品種(系)再進行一次檢定。進行第二次抗病性檢定時，需安排每品種(系)接種 12 株，三重覆，逢機完全區集排列之，同樣以感病品種 L 390 及抗病品種 Hawaii 7997 作為對照。接種後將植株放置於 28°C 的恆溫室中。於接種後第 4 、 7 、 10 、 14 、 21 及 28 天根據 Winstead & Kelment's rating scale (20)調查每個供試品種(系)的萎凋百分率。然後再計算其 disease index 及病害進展曲線下面積值(Area under disease progress curve, AUDPC) (17)，根據所得的面積值可檢測其抗感病反應。

Winstead & Kelment 的青枯病病害調查等級如下： 0=無病徵出現； 1=1 個葉片呈現部份萎凋； 2=2 個或 3 個葉片呈現萎凋； 3=除掉頂端 2 個或 3 個葉片外，其餘葉片均呈現萎凋； 4=所有葉片均呈現萎凋及 5=植株死亡。

Disease index=$[(N_0x1+N_1x1+N_2x2+N_3x3+N_4x4+N_5x5/NTx5)]x100\%$

AUDPC=$0.5x[(Y_i+Y_{i+1})x(X_{i+1}-X_i)]$

Y=disease incidence; X=days after inoculation

2.細菌性斑點病(Bacterial spot) 抗病性檢定方法(8)

(1)接種植株的準備：

先播種供試番茄種子於蛭石中，待發芽後再單株移植至直徑 9 公分的塑膠軟盆內之培養土，並放置於溫室內，五重複，每重複至少 6 株。以 Hawaii7998 作為抗病對照品種， CL5915-153-3-3-0 作為感病對照品種。株齡 30 天即可接種。

(2)菌種保存及接種源的準備：

此病害是由 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* 所引起。此菌菌種的保存可參照上述青枯病的保存法。接種前先將細菌性斑點病菌 Strain XVT-28 (Race 1 of tomato-pepper group)培養於 523 培養基，放置於 30°C ，經過 48 小時培養後，再挑取單一菌落，懸浮於無菌水中，吸取 0.3 ml 細菌懸浮液塗抹於 523 培養基或直接劃平板於 523 培養基增量，

放置於 30°C，經過 24 小時培養作為接種源。洗下的細菌懸浮液濃度先調整到 O.D.=0.3 at 600 nm，約 10^8 cfu/ml，再稀釋成所需的濃度 10^6 cfu/ml。

(3)人工接種及接種後放置的環境：

接種方法乃是將番茄苗株反轉而把地上部份浸泡(dipping)於懸浮液中30秒，此懸浮液中含有0.02% (v/v)的L-77 (Union carbide)，它是一種減少表面張力的溶液。然後將接種後的植株移至溫室(28°C)內。每次檢定時需重複測試兩次，接種後按逢機完全區集排列，各五重複檢測之。

(4)病害嚴重度的調查：

當接種後約 8-12 天，俟接種植株上之病斑完全展現時，估測每植株葉面積受害的百分率並按 Barratt & Horsfall (14)訂定的病害調查等級記錄每株被害等級，再計算每個供試品種(系)每重複的平均值。

Barratt & Horsfall 細菌斑點病調查等級：

病害等級	葉面積被害百分率
0	0
1	0-3
2	3-6
3	6-12
4	12-25
5	25-50
6	50-75
7	75-88
8	88-94
9	94-97
10	97-100
11	100

3.晚疫病(Late blight)抗病性檢定方法(8, 9, 12)

(1)接種植株的準備：

將供試番茄種子播種於直徑 6 公分塑膠軟盆內蒸氣消毒過的培養土中(土：砂：稻殼：堆肥=3 ： 1 ： 1 ： 1 ，v/v)，疏苗成每盆 1 株。每種材料各檢測 8 株。以 TS-33 或台中亞蔬四號作為感病對照品種而以 L 3708 作為抗病對照品種。再次檢定時，每種供試材料皆準備 24 株，分成 4 重複。株齡 30-35 天時即可接種。

(2)菌種保存及接種源的準備：

此病害是由 *Phytophthora infestans* 所引起。菌種保存時，先將此菌培養於裸麥 A 瓊脂(RAA) (13)的斜面試管內，放置 20°C 恆溫箱中生長，

待菌絲長滿全部斜面後，加入礦物油(Heavy white oil)至蓋滿菌絲為止並保存於 16°C 恆溫箱中。接種之前，首先將保存於礦物油內的菌種移出到裸麥 A 瓊脂(RAA)的斜面試管內，放置 20°C 恆溫箱中生長。經 12-20 天培養產孢後，加入 3 ml 的無菌水到斜面試管內，再以移植針磨擦菌落表面以釋放孢囊而製成孢囊懸浮液(10^3-10^5 孢囊/ml)。然後吸取 0.3 ml 孢囊懸浮液滴入已準備好的 RAA 平板(直徑 9 公分)內，再以消毒過的“L”形玻棒均勻蓋過平板的表面。將這些接種過的 RAA 平板培養於無光照的恆溫箱(20°C)中。經過 12-14 天後，每個平板都加入 15 ml 的無菌水再以“L”形玻棒磨擦菌落表面以收集孢囊懸浮液，連續做三次。全部收集的孢囊懸浮液以兩層紗布過濾之以除去菌絲碎片。最後以血球計數器計算孢囊的濃度並調至$5x10^4$/ml並移至12°C的恆溫箱中至少經過2小時以利游走孢子的釋放。

(3)人工接種及接種後放置的環境：

當播種後30至35天時，以微霧噴霧器將晚疫病菌株Pi 39(Race T2)的游走孢子/孢囊懸浮液均勻噴霧接種至每個植株的葉表面及莖部，直到滴落為止。接種後，將植株放在20±2°C，無光照而且100% RH的生長室維持24小時。然後將相對溼度調為60-95%而且每天照光(70 $\mu E \bullet m^{-2} \bullet s^{-1}$) 14小時。

(4)病害嚴重度之調查及抗感病反應之分類：

A.病害反應等級：

接種後第 7 天及第 10 天分別調查每個植株葉面積被害百分率，再依下列等級歸列之： 0=無病徵出現； 1=≤5%葉面積被害而且病斑相當細小； 2=6-15%葉面積被害而且呈現限制型病斑； 3=16-30%葉面積被害而且莖部無病斑； 4=31-60%葉面積被害而且或莖部出現少許病斑；5=61-90%葉面積被害或莖部出現擴展型病斑；及 6=91-100%葉面積被害或莖部受害嚴重或植株死亡。

B.抗感病反應的分類：

當求取每種供試材料四個重複的病害等級平均值後，再依下列三個等級分類其抗感性反應：高度抗病=0-2.5 等級；中度抗病=2.6-4.0 等級；感病=4.1-6.0 等級。

4.黑黴病(Black leaf mold)抗病性檢定方法(7,8,9)

(1)接種植株的準備：

將供試番茄種子播種於直徑 6 公分塑膠軟盆內蒸氣消毒過的培養土中(土：砂：稻殼：堆肥=3 ： 1 ： 1 ： 1 ， v/v)，疏成每盆 1 株。每種材料各準備 24 株，分成 4 重複，按逢機完全區集排列於溫室內。以台南選 2 號(TN 2)作為感病對照品種而且以 L 733 為抗病對照品種。

(2)菌種的保存及接種源的準備：

此病害是由 *Pseudocercospora fuligena* 所引起。菌種保存時，先將此菌培養於番茄葉抽出液混合麥精片抽出液培養基(Tomato Oatmeal agar, TOA) (2)平板上。TOA 培養基是將 50 公克罹病品系番茄葉碎片加入 500 ml 蒸餾水煮沸，取其過濾汁液。另外以 15 公克燕麥片加入 500 ml 蒸餾水煮沸，取其過濾液與番茄葉汁液等量混合後，每公升再加入 20 公克瓊脂粉，經高壓滅菌後，先調整 pH 值為 6.0 再倒成平板。經 7-10 天，28°C，每天照光12小時的培養產孢後，加入脫脂奶粉沖泡且經高壓滅菌後的牛乳而製成孢子懸浮液，再吸取滴入0.4ml裝有矽膠凝體(Silica gel) (16)的小試管(14x60 mm)內，放於4°C恆溫箱保存。

接種之前，可先將保存菌種(pf-2)的矽膠凝體撒於TOA平板上，放於28°C恆溫箱，每天照光12小時，經7-10天培養產孢後，再大量繁殖製成孢子懸浮液，濃度調為$1x10^4$分生孢子/ml做為接種源。

(3)人工接種及接種後放置的環境：

當供試材料種植 28-30 天後，以微霧噴霧器將孢子懸浮液均勻地接種至所有測試的植株葉片，直到滴落為止。接種後，將植株放在 28±2°C，無光照而且 100% RH 的生長室內維持 24 小時，然後將相對溼度調為 98±2%而且每天照光(70 $\mu E \bullet m^{-2} \bullet s^{-1}$) 14 小時。每種供試材料按逢機完全區集設計排列之。

(4)病害嚴重度的調查及抗感病反應之分類：

接種後第14天調查每植株葉面積被害百分率，再計算每種供試材料葉面積被害百分率的平均值，最後參考抗、感病對照品種(系)的被害百分率及下列等級分類其抗感病反應：抗病(R)=<10%葉面積被感染，類似 L 733；中等抗病(MR)=10-30%葉面積被感染；中等感病(MS)=30-50%葉面積被感染；感病(S)=50-70%葉面積被感染及高度感病(VS)=>70%葉面積被感染，類似TN 2。

5.萎凋病(Fusarium wilt)抗病性檢定方法(9, 10)

(1)接種植株的準備：

將供試番茄種子播種於消毒過的河砂與Peat-lite (Bio-Mix potting soil)混合 (2：3 v/v)的培養土中。每種供試材料均需有 24 株，分成 4 重複，以供 1 個菌株接種之用。下列五種標準的對照品種需排列其中： Bonny Best (無抗病性)， Fantastic (無抗病性)， UC 82-L (抵抗 Race 1)， Florida MH-1(抵抗 Race 1 & 2)及 I3R-1(抵抗 Race 1,2,3)。

(2)菌種的保存及接種源的準備：

此病害是由 *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici* 所引起。菌種保存時，先將此菌培養於 PDA 斜面試管內，經 7-10 天，28°C，每天照光 12 小時的培養產孢後，加入脫脂奶粉沖泡的牛乳且經高壓滅菌後而製成孢子懸浮液，再吸取0.4ml滴入裝有消毒過的矽膠凝體(16)的小試管(14x60 mm)內，放於4°C恆溫箱保存。

接種前 7-10 天，可先將保存菌種(Race 1 & 2)的矽膠凝體撒於 PDA 平板上，放置於 25°C 恆溫箱中。待長出後即可大量繁殖之。接種前，以每平板配合 125 ml 的無菌水之比例在果汁機內打碎 10 秒鐘製成菌泥。

(3)人工接種及接種後放置的環境：

接種時，先將播種後2週欲檢測的苗株拔起，稍加振動，使附著於根部的土壤混合物掉落，再將根部浸泡在菌泥中3-5分鐘，然後移植到裝有上述培養土的穴植盤中(4.2x4.2x5.5 cm/穴)。接種後的植株，需安排於溫度等於或超過25°C的溫室或生長室內。接種後1週及2週施予水溶性肥料1,000倍(BASF Foliar Nitrophoska, 20:19:19:0.5)。

(4)病害嚴重度的調查及抗感病反應之分類：

當接種三週後，根據下列等級調查每一植株的反應： 0=無病徵； 5=矮化且維管束變褐色； 7.5=嚴重矮化而且維管束變色； 10=嚴重地萎凋或死亡。任何一個供試材料其每一植株病害嚴重度的平均值小於 5 時，即可歸列為抗病反應。至於抗那一個生理小種，則需與對照品系相比較。

6.番茄嵌紋病毒病(Tomato mosaic virus, ToMV)抗病性檢定方法(10)

ToMV 是保存於煙草(*Nicotiana tabacina* Samsun)葉片。大量接種前，利用純化過的 Tomato strain 0 和 1 以 0.01 M ， pH 7.0 的磷酸鈉緩衝液稀釋 20 倍，並加 2%的 Celite 替代金鋼砂，然後以壓力噴霧槍，來回三次高壓噴霧(3.5 kg/cm^2)在剛長完第二本葉的幼苗葉片上。少量接種時，可先撒佈金鋼砂於葉面上，再用棉花棒沾接種源塗抹之。當兩種方法接種完成後，隨之以清水沖洗葉片，以減少傷害，並放置於溫室內。每種供試材料至少測試 24 株。 TK 70 做為感病對照品種。接種 1 週後，檢查每個植株病斑出現與否，再計算每種供試材料的植株出現病徵百分率。最後依照下列等級歸類供試材料的抗感病反應：免疫=0%植株感染；抗病=<20%植株感染；中等抗病=21-40%植株感染；中等感病=41-75%植株感染；感病=>75%植株感染。

7.胡瓜嵌紋病毒病(Cucumber mosaic virus, CMV)抗病性檢定方法(6, 8, 10)

CMV 的兩個菌株 Peets 及 NT-9 是保存於煙草(*N. glutinosa*)葉片。當供試材料第二本葉完全展開時，取 1 克的 Peets 菌株罹病葉加 4 倍的 0.03 M 、pH 7.0 之磷酸緩衝液含 0.5%亞硫酸鈉(Na_2SO_3)、 sodium diethyl-dithiocarbamate (1.7 g/l)及 charcoal (100 mg/l)製成接種源，以人工擦拭法接種於葉片上。一週後，再以同樣方法接種第二菌株 NT-9 。再經兩週後，除非病徵特別清楚，否則摘取每個植株葉片以酵素免疫分析法(ELISA)測試之。出現負反應的植株自第三葉以上部份剪掉，待新葉長出後再接種上述兩個菌株之混合液。經兩週後仍再以 ELISA 測試之。以 TK 70 做為感病的對照品種。依上述方法歸類供試材料之抗感病反應。

8.馬鈴薯 Y 病毒病(Potato virus Y, PVY)抗病性檢定方法(10)

PVY 是保存在煙草(*N. tabacina* Xanthi)葉片。除接種株齡約在種植後 25 天(4-5 葉)左右外，其餘均照上述 CMV 抗病性檢定方法進行測試。

9.番茄黃化捲葉病毒病 (Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV) 抗病性檢定方法(6, 8, 9, 10)

TYLCV-TW 是保存在罹病的 TK 70 番茄葉片。先在網室內種植罹病的 TK 70 番茄，繁殖媒介昆蟲銀葉粉蝨。當供試番茄材料長至 2-3 本葉時，移入網室內接受媒介昆蟲傳毒。經過一個月後，沒病徵出現的植株取回葉片在實驗室以核酸雜合(nucleic acid hybridization)方法測試病毒存在與否? 最後再以上述的等級歸列供試材料之抗感病反應。

10.根瘤線蟲(Root-knot nematode)抗病性檢定方法(4)

由於所用抗根瘤線蟲種源，分別來自美國夏威夷和加州兩個不同系統，前者只能用人工接種法測試之(接種濃度 2,000 eggs/植穴)，而加州系統具有 Mi 基，與 'Aps-1' 基因連鎖，所以後者用人工接種法或澱粉膠體電泳法(Starch gel electrophoresis method, SGE)均可。

(1)人工接種檢定法(Egg inoculation method)：

A.取自病原繁殖圃之罹病番茄根部清洗後並切碎，放入大型三角瓶內，加入適量的漂白水(NaOCl ，有效成份 0.5%)，充分振盪 2-4 分鐘，以洗下卵，不可太久，否則卵會死亡。

B.迅速以 200 目及 500 目的細篩過濾網(200 目者在上層)過濾之。

C.洗下之卵再立即以自來水清洗乾淨。

D.用蒸餾水稀釋成為濃度 1,000 卵/毫升。

E 檢定供試材料前先注入 2 毫升接種源於每個植穴內，再移入株齡 10 天的番茄苗並覆土(土：砂=2 ： 1)，每天定量澆水。

F.接種一個月後，小心挖取供試植株根部，再按 1978 年 Sassar, J.N.與 Taylor, A.L. (19)訂定的標準等級調查記錄其感染等級，等級分類如下：0 (極度抗病)=沒根瘤出現；1 (抗病)=每株 1-2 個根瘤；2 (中度抗病)=每株 3-10 個根瘤；3 (中度感病)=每株 11-30 個根瘤；4 (感病)=每株 31-100 個根瘤；5 (極度感病)=每株根瘤超過 100 個。

G.每次檢定時，皆需包含已知的感病品種(Tk-70)及抗病品種(L-345 (Calmart))作為對照。

(2)澱粉膠體電泳法(Starch gel electrophoresis method)：

A.澱粉水解和膠體製備：

a.將 1 公斤馬鈴薯澱粉加入 1 公升丙酮(acetone)，放置燒瓶中並封住瓶口。

b.於 50°C 恆溫下水浴 4 小時後，加入 10 c.c.的濃鹽酸水解 80 分鐘，再利用真空幫浦抽真空以除去上層丙酮。

c.置於漏斗中水洗約 5 分鐘後，再加入丙酮 500 ml 去水、風乾。

d.將澱粉加入膠體緩衝液，配成 10-14%澱粉液。

e.置於沸水中加熱並搖動(即加熱糊化)，使澱粉變成透明膠體，趁熱抽氣，除去氣泡。

f.置於已抹上石腊之壓克力電解槽中，以玻璃片壓平，冷卻即成膠體，存入冰箱備用。

B.樣品製備及電泳法：

a.採取新鮮番茄幼葉 1 片(4-5 本葉期)，加入萃取液磨碎之，然後以小塊濾紙吸取汁液，再置入膠體中。

b.膠體平置於電解槽中，兩邊以濾紙連接膠體和電泳緩衝液，膠體上覆以保鮮膜。

c.電壓調至 270 volt，約經 3-4 小時後，待膠體上之記號跑至約 8 公分長時，切斷電源，取下膠體。

C.染色和固定：

將膠體剖切成兩半，置於染色盤中，再加入染色液染色約 4 小時，倒出染色液再加入固定液保存。

D.膠體之判別：

依據膠體最上面的三條染色帶、染色程度及顯現程度加以判別抗感病反應。

a.若呈現三條淺色的染色帶，則為抗病異質體 Aps-$1^{1/+}$。

b.若最上方呈現一條淺色的染色帶，則為感病個體 Aps-$1^{+/+}$。

c.若只出現最下方的染色帶且染色極深，則為抗病同質體 Aps-$1^{1/1}$。

近年來由於生物科技的進步，已開發國家的番茄品種改良研究均已利用生物科技來加速進展。目前亞蔬中心的番茄抗病育種計畫也已利用多項生物技術正積極進行各項抗病檢定，諸如鑑定與晚疫病抗病基因相連接的 RAPD marker 以及與 CVMV 連接的 RAPD marker，以提高抗病檢定之效率。利用 DNA probes & primers 偵測番茄的青枯病菌及番椒的細菌性斑點病菌，利用 PCR (polymerase chain reaction) 偵測番茄組織的青枯病菌，應用 Molecular marker 的技術加速 TLCV-TW、CMV、PVY 抗病基因的逐步轉移，以及利用 Embryo cloning technique 使 *L. escu.* x *L. chilense* 的雜交後代具有 TLCV-TW 的抗病性(8, 9, 10)。

二、番椒(Pepper)

1.胡瓜嵌紋病毒病(Cucumber mosaic virus, CMV)抗病性檢定方法(9, 10)

CMV 是保存於煙草(*N. glutinosa*)葉片。取 1 克的罹病葉加 4 倍的 0.1 M，pH 7.0 的磷酸緩衝液含 0.1 M disodium ethylenediaminetetraacetate (EDTA)、0.02 M sodium diethyl-dithiocarbamate (DIECA)、0.17 M ascorbic acid (vitamin C)製成接種源。當供試材料長出第一本葉並完全展開時，以人工擦拭法接種於葉片上。每種供試材料至少都接種 24 株，以 Yolo Wonder，Early calwonder 及 Florida VR-2 做為感病對照品種。待供試材料長至第五本

葉時，只留下方 1 至 4 本葉而將頂端部份剪去，再以人工擦拭法接種於第 3 本葉。經兩週後，摘取新長出的嫩葉以 ELISA 法測試之。再計算每種供試材料的植株呈現正反應的百分率並與對照品種比較之。

2.番椒葉脈斑駁病毒病(Chili veinal mottle virus, CVMV)抗病性檢定方法（9, 10）

CVMV 是保存於煙草(*N. glutinosa*)葉片。當供試材料長至 3-4 本葉時，取 1 克的罹病葉加 4 倍的 0.1 M ，pH 7.0 的磷酸緩衝液(方法如上述 CMV)製成接種源，以人工擦拭法接種於葉片上。每種供試材料至少都接種 24 株，以 Yolo Wonder ，Early calwonder 及 Florida VR-2 做為感病對照品種。隔 1 週後，再以同樣方法接種一次。經兩週後，取回無典型病徵出現之植株葉片，以 ELISA 法測試之。留下呈現負反應之植株並剪去頂端部份，經 1 週後，待新葉長出再接種一次。經兩週後並無出現病徵者，取回葉片再以 ELISA 測試之。

3.馬鈴薯 Y 病毒病(Potato virus Y, PVY)抗病性檢定方法(9, 10)

PVY 是保存於煙草(*N. tabacina* Xanthi)葉片。此病毒之抗病性檢定方法完全依照上述 CVMV 的檢定方法。

4.煙草嵌紋病毒病(Tobacco mosaic virus, TMV)抗病性檢定方法(9, 10)

此病毒是屬於 Tobamovirus ，保存於煙草(*N. sylvestris*)葉片，其抗病性檢定方法完全依照上述 CVMV 的檢定方法。

5.番茄嵌紋病毒病(Tomato mosaic virus, ToMV)抗病性檢定方法(9, 10)

此病毒亦是屬於 Tobamovirus ，保存於煙草(*N. tabacina* Samsun)葉片，其抗病性檢定方法完全依照上述 CVMV 的檢定方法。

6.番椒微斑駁病毒病(Pepper mild mottle virus, PMMV)抗病性檢定方法(9, 10)

此病毒亦是屬於 Tobamovirus ，保存於煙草(*N. debneyi*)葉片，其抗病性檢定方法完全依照上述 CVMV 的檢定方法。

7.疫病(Phytophthora blight) 抗病性檢定方法(9, 10)

(1)接種植株的準備：

將供試番椒材料的種子播種於 72 格穴植盤(每格大小為 4.2x4.2x5.5 cm^3)內的培養土中，培養土為 peat-lite mix (Bio-Mix Potting Soil ，Nevama B.V.)，發芽後每穴疏成 1 苗。初次檢定時，每種供試材料測試 24 株，進一步檢定時，每種供試材料至少測試 72 株，分成 4 個重複，安排種植於不同的穴植盤，放置於溫室內，以逢機完全區集設計排列之。每次檢定時均以 PI 201234 做為抗病對照品種，以藍星(甜椒)及 PBC 137 (辣椒， CNPH 703)做為感病對照品種。

(2)菌種保存及接種源的製備：

此病害是由 *Phytophthora capsici* 所引起的。菌種欲作保存之前，先將此菌培養於 V8 汁液瓊脂培養基的斜面試管內，放置 28°C 恆溫箱中生

長。待菌絲長滿全部斜面後，加入礦物油至蓋滿菌絲為止並保存於 20°C 恆溫箱中。接種之前，選取致病力最強的菌株 Pc17E 培養於 V-8 汁液瓊脂培養基(直徑 9 cm)，放置於 28°C 恆溫箱中培養 7 天。取出培養基平板再以消毒過的刀片切成四等份並將每等份移至一消毒過的空培養皿內，隨之切成每塊約 0.5-1.0 cm^2。然後每皿加入無菌水，使之蓋過每一瓊脂塊，放置於室內 1-2 小時，再吸掉無菌水。隨之每皿加入 18 ml 的新鮮無菌水，讓它剛好達到每個瓊脂塊的上方邊緣。隨後將它移入 28°C 恆溫箱培養 24 小時(連續照光)，以促進孢囊的產生。再將它移入 4°C 的恆溫箱中放置 1 小時，以促進游走孢子的形成。最後將所有培養皿移到室溫下經 30-60 分鐘，以促進游走孢子的釋放。所得到游走孢子懸浮液放在低溫下保存並取出代表的樣品滴在血球計數器上放在 4°C 或放在 Slide warmer 烘一下，以固定游走孢子的游動而計算其濃度。

(3)人工接種及接種後放置的環境：

將游走孢子濃度調至 $1x10^5$ zoospore/ml，接種到株齡 30-35 天的每種供試材料的每一植株基部各 5 ml。接種後的植株安排放置在溫室內，溫度需維持在 28°C 以上，每天澆水兩次，以維持高溼度的土壤。

(4)病害反應的調查及抗感病反應的分類：

接種經過 7，14 及 21 天後，調查每種供試材料每一重複的植株存活百分率並求取每種供試材料的植株存活率，再按下述等級歸類其抗感病之反應：高度抗病=植株存活率大於 80%；中度抗病=植株存活率為 50-79%；中度感病=植株存活率為 30-49%及；高度感病=植株存活率低於 29%。

8.炭疽病(Anthracnose)抗病性檢定方法(8, 11)

(1)接種果實的準備：

先將供試材料種植於 30 公分寬的盆內，待其開花、結果、成熟時，採取每種供試材料成熟度較為一致的成熟健康果實 40 個，分為四個重複。或者亦可在田間炭疽病發生不嚴重的季節裡，採取田間健康成熟的果實作為接種之用。以 PBC 80 作為抗病對照品種，而以 PBC 714 (PI 201234)作為感病對照品種。果實成熟前一週的綠果亦可收取作為檢定之用，以便與成熟果之反應比較之。

(2)菌種保存及接種源之準備：

此病害主要由 *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. acutatum* 及 *C. capsici* 所引起。菌種保存時，先將此菌培養於 PDA 斜面試管內，在 28°C 恆溫箱中培養 5-7 天產孢後，加入脫脂奶粉沖泡且經高壓滅菌後的牛乳而製成孢子懸浮液，再吸取 0.4ml 滴入裝有矽膠凝體的小試管內，移入 4°C 恆溫箱中保存。接種之前，需決定要針對那個 species 進行檢定，再將保存那個菌種的矽膠凝體撒於 PDA 平板上，放於 28°C 恆溫箱中，每天照光 12 小時。經 7-10 天培養產孢後，加入無菌水，刮取其分生孢子，製成孢子懸浮液，濃度調為 $5x10^5$ 分生孢子/ml 做為接種之

(3)人工接種及接種後放置的環境：

前面所述的每種供試材料各 40 個果實，按完全逢機排列於一塊木板(29.5 公分 x21.5 公分)的十個條溝上。以長度 0.75 厘米的細針在每個果實的中央部位各刺一孔並注入 1 μl 的孢子懸浮液。當全部接種完畢後，關掉室內燈光，溫度調為 25±1°C ，相對溼度 100%，以利病原菌的侵入感染。但應注意勿讓果實表面凝結水滴，以減少雜菌的污染。接種 24 小時後，相對溼度調為 95-98%，以防止腐生雜菌在果蒂及接種部位的繁殖。

(4)病害嚴重度的調查：

接種經 6 天後，檢查每一接種部位的病斑擴展情形，若病斑>4 厘米時，即列為感病反應。先求出每個重複果實感病的百分率，然後再求出每種供試材料的四個重複平均值，最後與抗病、感病對照品種比較之。

9.青枯病(Bacterial wilt)抗病性檢定方法(8)

(1)接種植株的準備：

先將每種供試材料播種於直徑 9 公分塑膠軟盆內蒸氣消毒過之培養土中(土：砂：堆肥：稻殼 =3 ： 1 ： 1 ： 1)。發芽後，每盆疏苗成 1 株，每一重複 8 株。每種供試材料各需三個重複，按逢機完全區集設計排列之。每次檢定以 PBC 66 (MC-4)做為抗病對照品種，而以 C 0835 (Orias Kossarv)當做感病對照品種。

(2)菌種保存及接種源的準備：

此病害是由 *Ralstonia solanacearum* 所引起。菌種的保存方法及接種源的準備工作可參照上述番茄青枯病菌的方法。

(3)人工接種及接種後放置的環境：

當供試材料萌芽後 28 天，準備青枯病菌株 Pss 71 為接種源，細菌懸浮液的濃度為 10^8 cfu/ml 。進行人工接種時，先以刀子距離植株莖基部 1.5 cm 處切斷其根部，然後均勻倒入 30 ml 細菌懸浮液到每個育苗盆的培養土中。接種後，將植株安放在溫度維持 28°C 的溫室中。

(4)病害嚴重度的調查：

接種後第 4 ， 7 ， 10 ， 14 ， 21 及 28 天調查每種供試材料的植株萎凋百分率。植株的所有葉子呈現萎凋才計算為萎凋的植株。最後與抗、感病對照品種比較之。

10.細菌性斑點病(Bacterial wilt)抗病性檢定方法(9)

(1)接種植株的準備：

先播種供試番茄種子於蛭石中，待發芽後再單株移植至直徑 9 公分的塑膠軟盆內蒸氣消毒過之培養土中(土：砂：堆肥：稻殼 =3 ： 1 ： 1 ： 1)，放於溫室內。每種供試材料各有三重複，每個重複有 8 株。以 PBC 137 (CNPH 703)為抗病對照品種，而以 PBC 485A (Nacional AG-506)為感病對照品種。

(2)菌種保存及接種源的準備：

此病害亦是由 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* 所引起。菌種的保存方法及接種源的準備工作可參照番茄細菌性斑點病的方法。

(3)人工接種及接種後放置的環境：

當供試苗株長到四個本葉完全展開時，移入暗室經過一夜後，隔天早晨進行人工接種。接種方法乃是將苗株反轉而把地上部份浸泡於細菌性斑點病菌株 XvT 28 的懸浮液中 30 秒，其濃度為 10^8 cfu/ml 內含有 0.05% (v/v) L-77，以減少表面張力。接種後的植株放置於 28°C 的生長室內按逢機完全區集設計排列並接受自然光照射。

(4)病害嚴重度的調查：

接種 8-12 天後，根據 Barratt and Horsfall (14)訂定的病害調查等級記錄每株被害等級，再計算每種供試材料每重複的平均值(可參照上述番茄細菌性斑點病抗病等級)。最後與抗、感病對照品種比較之。

三、茄子(Eggplant)

1.青枯病(Bacterial wilt)抗病性檢定方法(8, 9, 10)

(1)接種植株的準備：

先播種供試茄子種子於直徑 6 公分的塑膠軟盆內蒸氣消毒過的培養土(土：砂：堆肥：稻殼 = 3 ： 1 ： 1 ： 1 ， v/v)中，發芽後疏成每盆 1 株。每種供試材料各種 45 株，分成三重複，按逢機完全區集設計排列於不同的育苗箱中。以 Surya 及 Terong Hijau 做為抗病對照品種，而以 EG Bonne 做為感病對照品種。

(2)菌種保存及接種源的準備：

此病害是由 *Ralstonia solanacearum* 所引起。菌種保存方法及接種源的準備工作可參照番茄青枯病菌的方法。

(3)人工接種及接種後放置的環境：

當株齡 30 天時，以斷根及土壤接種法，先用刀子距植株莖基部 1.5 cm 處切斷其根部，再將青枯病菌株 Pss 79 的細菌懸浮液(濃度為 10^8 cfu/ml) 30 ml 倒注於每盆土壤中，使土壤溼透。接種後維持土壤的高溼度並且安放於溫度維持在 25-32°C 的溫室內。

(4)病害嚴重度的調查：

接種後，每天觀察病害的進展並記錄每種供試材料呈現萎凋及死亡的日期。除外，每 7 天按下列等級調查每種供試材料各個植株之病害反應：0=無病徵出現；1=僅 1 個葉片呈現萎凋；2=2-3 葉片呈現萎凋；3=除頂端 2-3 葉片外，其餘葉片均萎凋；4=所有葉片均呈現萎凋；及 5=死亡。一直調查至接種後 28 天為止。調查結束時再以下列公式計算求得 Disease index = $[(N_0 \times 1 + N_1 \times 1 + N_2 \times 2 + N_3 \times 3 + N_4 \times 4 + N_5 \times 5 / NT \times 5)] \times 100\%$。

計算所得 Disease index (DI)再依據下列等級歸類供試材料的抗感病反應：抗病(R)=DI<10%；中等抗病(MR)=DI 為 10-20%；中等感病(MS)=DI 為 20-40%；及感病(S)=DI>40%。

2.根瘤線蟲(Root-knot nematode)抗病性檢定方法(4, 19)

請參考番茄根瘤線蟲抗病性檢定方法的人工接種根瘤線蟲卵法測之。

綜合以上所述，吾人可知蔬菜作物抗病育種的成功，需要育種人員與植病人員互相密切合作地完成下列八項工作： 1)廣泛地收集國內外的種原或品種； 2)標準抗病檢定技術的建立； 3)病原生理小種或變異的探討； 4)寄主抗病遺傳性的瞭解； 5)抗病種原的鑑定； 6)重要園藝性狀遺傳性的瞭解； 7)正確育種目標的建立；以及 8)正確育種方法的執行。否則的話，容易造成事倍功半，甚至於一事無成。

參考文獻

1.王添成　1996　茄科蔬菜之抗病育種　Pages 46-89.　in ：健康清潔植物培育研習會　中華民國植物病理學會主編　台北　台灣

2.王添成　1996　番茄黑黴病菌培養特性及寄主抗病性　博士論文　國立中興大學植物病理學研究所　台中　台灣　178 pp

3.吳文希　1992　植物病理學　茂昌圖書有限公司　台北　台灣　405 pp

4.陳正次　1988　生果番茄遺傳改良　Pages 121-144　in ：蔬菜品種改良研討會專刊　陳榮五及李善忱主編　台東區農改場　台東　台灣

5.Agrios, G.N. 1978. Plant Pathology (2nd ed.) Academic Press. NY.

6.AVRDC. 1992. AVRDC 1991 Progress Report. The Asian Vegetable Research and Development Center. Shanhua, Tainan, Taiwan, R.O.C. 411 pp.

7.AVRDC. 1993. AVRDC 1992 Progress Report. The Asian Vegetable Research and Development Center. Shanhua, Tainan, Taiwan, R.O.C. 523 pp.

8.AVRDC. 1994. AVRDC 1993 Progress Report. The Asian Vegetable Research and Development Center. Shanhua, Tainan, Taiwan. R.O.C. 537 pp.

9.AVRDC. 1995. AVRDC 1994 Progress Report. The Asian Vegetable Research and Development Center. Shanhua, Tainan, Taiwan. R.O.C. 520 pp.

10.AVRDC. 1996. AVRDC 1995 Progress Report. The Asian Vegetable Research and Development Center. Shanhua, Tainan, Taiwan. R.O.C. 187 pp.

11.AVRDC. 1998. AVRDC 1997 Progress Report (in press). The Asian Vegetable Research and Development Center. Shanhua, Tainan, Taiwan. R.O.C.

12.Black, L.L., Wang, T.C., Hanson, P.M., and Chen, J.T. 1996. Late blight resistance in four tomato accessions: effectiveness in diverse locations and inheritance of resistance. Paper was presented in the 1996 American Phytopathology Society Meeting. U.S.A. In:Phytopathology 86:11(s):24(Abstr.).

13.Caten, C.E., and Jinks, J.L. 1978. Spontaneous variability of single isolates of Phytophthora infestans I. Cultural variation. Can. J. Bot. 46:329-348.

14.Horsfall, I.G., and Barratt, R.W. 1945. An improved grading system for measuring plant diseases. Phytopathology 35:655 (Abstr.).

15.Kenaga, C.B. 1986. Principle of Phytopathology (2nd ed.). Waveland Press. Inc., Illinosis, U.S.A. p. 285-300.

16.Perkin, D.D. 1962. Preservation of Neurospora stock cultures with anhydrous silica gel. Canadian Journal of Microbiology 8:591-594.

17.Shanner, G., and Finney, R.E. 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. Phytopathology 67:1051-1056.

18.Sherf, A.F., and MacNab, A.A. 1986. Vegetable Diseases and Their Control. John Wiley & Sons. NY. U.S.A. 728 pp.

19.Taylor, A.L. and Sasser, J.N. 1978. Biology, Identification and Control of Root-knot Nematode (Meloidogyne spp.). Dept. Plant Pathology, N. C. State University, and USAID. 111 pp.

20.Winstead, N.N., and Kelman, A. 1952. Inoculation techniques for evaluating resistance to *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathology 42:628-634.